



На правах рукописи

Мещерякова Ольга Владимировна

**ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТОВ
ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
И α -ГЛИЦЕРОФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ РЫБ
К РАЗЛИЧНЫМ ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Специальность 03.00.04 - биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петрозаводск - 2004

Работа выполнена в лаборатории экологической биохимии
Института биологии Карельского научного центра
Российской Академии Наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Немова Нина Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Озернюк Николай Дмитриевич

кандидат биологических наук, доцент
Судакова Надежда Михайловна

Ведущее учреждение: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита состоится "22" апреля 2004 года в 14 часов на заседании диссертационного совета КМ 212.087.01 при Карельском Государственном педагогическом университете по адресу: 185035 Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17, ауд. 113 главного корпуса.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельского государственного педагогического университета.

Автореферат разослан "20" марта 2004 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета



Малкиель А.И.

Актуальность темы. Одной из актуальных проблем современной биологии является вопрос о механизмах адаптации организмов к постоянно изменяющимся условиям среды. Основная роль в поддержании постоянства уровня метаболизма при влиянии различных факторов среды на организм отводится ферментам. Многие, ключевые и регуляторные ферменты представлены в клетке виде изоферментных систем. Присутствие в клетке изоферментов; различающихся по структурным, физико-химическим и кинетическим свойствам, клеточной компартментализации, а также ткане- и видоспецифичности наряду с другими механизмами, обеспечивает быструю и тонкую регуляцию клеточного метаболизма в условиях приспособления организма к постоянным изменениям внешней среды (Market, 1968; Ньюсхолм, Старт, 1977; Хочачка Сомеро, 1988). Особенности распределения и активности изоферментов в различных органах и тканях организма обусловлены характером и направленностью обменных процессов в данном органе, его функцией, а также физиологическим состоянием организма. Исследуемые нами изоферментные системы лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы (МДГ) и α-глицерофосфатдегидрогеназы (α-ГФДГ) катализируют реакции дегидрирования в углеводном обмене и регулируют уровень окислительно-восстановительного потенциала клетки — важнейшего фактора клеточного гомеостаза (Мецлер, 1981). Изоферменты ЛДГ осуществляют взаимопревращения лактата и пирувата, участвуя либо в завершении гликолиза с образованием лактата, либо в окислении лактата в пируват, который поступает в цикл трикарбоновых кислот или в глюконеогенез — путь синтеза глюкозы. Изоферменты МДГ и α-ГФДГ, конкурируя с ЛДГ за цитоплазматический НАДН (Gurru, Nochachka, 1978), участвуют в челночных механизмах переноса восстановительных эквивалентов между цитоплазмой и митохондриями клетки. Кроме этого, МДГ участвует в цикле трикарбоновых кислот (только митохондриальные изоферменты) и в одной из реакций глюконеогенеза. Важная роль α-ГФДГ состоит также в обеспечении глицерофосфатом процессов биосинтеза триацилглицеридов (Harmon, Sheridan, 1992).

У рыб наблюдается большое разнообразие изоферментов, что связано, прежде всего, с различными условиями их существования и принадлежностью к группе эктотермных животных. Тетраплоидные виды рыб, в связи с их происхождением, имеют еще большее количество изоферментов ЛДГ МДГ и α-ГФДГ (Massaro, Market 1968, Bailey, Wilson, 1969; Слынько, 1976; Henry, Ferguson, 1986; Stahl, Ryman, 1982). Очень широко освещен в литературе вопрос о количестве, распределении и свойствах изоферментов ЛДГ у рыб (Market, Holmes 1969; Shukoliukov et al., 1976; Stoika et al., 1978; Rehse, Davidson 1986 и многие др.). Менее изучены изоферменты МДГ (Starzyk, Merritt, 1980; De Luca, 1983; Walton, 1985; Tripathi, 1993 Lin et al 2002; Merritt, Quattro, 2003) и α-ГФДГ (Basaglia, Cucchi, 1995; Basagli 2000).

Не смотря на то, что имеется большое количество работ, касающихся структурных и функциональных свойств изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ, а также работ по изучению влияния на них температуры, особенно для ЛДГ (Клячко, Озернюк, 1991,1995, 1998; Klyachko, Ozernyuk, 1994,1998; Fields, Somero, 1998; Fields et al., 2001; Sharpe et al., 2000), некоторые аспекты этого вопроса, такие как: дифференциальная роль отдельных изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ в адаптациях рыб к загрязнению окружающей среды или изучение комплексного воздействия факторов на изоферменты остаются еще слабо изученными. Недостаточно исследованным остается также вопрос о дифференциальной роли изоферментов в регуляции метаболизма при заболеваниях рыб.

Исходя из выше изложенного, представлялось интересным исследовать роль изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ некоторых видов рыб в эколого-биохимических адаптациях к различным факторам окружающей среды. Для более глубокого понимания роли этих ферментов в регуляции метаболизма при различных воздействиях было необходимо дополнительно проанализировать активность некоторых других ферментов углеводного обмена (альдолазы, цитохром с оксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы), а использованный при этом метод корреляционного анализа, позволил оценить взаимосвязь отдельных метаболических путей.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение изменений в активности изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ при адаптациях рыб к различным факторам окружающей среды.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать распределение изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ в различных органах рыб, отличающихся экологией и эволюционным положением.
2. Исследовать различия в активности изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ, а также некоторых других ферментов углеводного обмена у окуней с различным уровнем накопления ртути в мышцах и обитающих в озерах с различной кислотностью (рН) и цветностью (гумифицированностью).
3. Исследовать влияние загрязнения водной среды техногенными отходами горно-обогатительного производства на активность изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ и других ферментов углеводного обмена у плотвы.
4. Изучить изменения в активности изоферментов ЛДГ, МДГ и других ферментов углеводного обмена в органах молоди семги при заболевании некрозом плавников.

Научная новизна. Получены-новые данные, дополняющие существующую информацию о ткане- и видоспецифичности изоферментов ЛДГ, МДГ и а-

ГФДГ у пресноводных рыб. Впервые изучено влияние накопления ртути в мышцах рыб и сопутствующих этому процессу факторов среды (кислотность и гумифицированность водоема) комплекса факторов водной среды (рН, содержание гуминовых кислот и количества ртути в мышцах) на активность изоферментов исследуемых дегидрогеиаз. Впервые получены результаты о влиянии загрязненности техногенными отходами горнообогатительного производства на углеводный обмен в органах плотвы. Впервые получены данные об изменении активности исследуемых ферментов и других ферментов углеводного обмена в органах лосося при заболевании некрозом плавников.

Практическое значение работы. Полученные результаты и сделанные на их основании выводы расширяют представления о дифференциальной роли изоферментных систем ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ в биохимических адаптациях рыб к различным факторам окружающей среды. Анализ результатов по изучению влияния факторов среды, в том числе и антропогенных, на исследуемые ферменты свидетельствует о возможности использования их в оценке физиологического состояния рыб и для решения задач эколого-биохимического мониторинга водоемов. Полученные данные о роли исследованных ферментов в регуляции метаболизма при развитии заболевания плавниковым некрозом у рыб могут быть использованы для ранней диагностики и профилактики заболеваний у искусственно разводимых ценных видов рыб. Материалы диссертации используются в лекционных курсах «Экологическая биохимия» и «Введение в энзимологию» для студентов ПетрГУ и КГПУ.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены на международных и всероссийских конференциях в период с 1999 по 2003 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из которых 2 статьи и 11 тезисов докладов и 2 статьи приняты к печати.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Диссертационная работа изложена на 149 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц, 22 рисунка. Список цитируемой литературы включает 252 названия из них 72 отечественных.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность сотруднику лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского научного центра РАН. А.И. Груздеву за помощь в работе и ценные рекомендации, а также всем коллегам за постоянную поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Литературный обзор

В главе отражены современные представления о структуре, свойствах и роли изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ у рыб. Рассмотрены особенности метаболизма некоторых органов рыб, качественный, количественный состав гооферментов, их активность. Обобщены уже имеющиеся в литературе данные о роли изоферментов исследуемых дегидрогеназ в регуляции метаболизма при биохимических адаптациях рыб к различным факторам окружающей среды (температуре, антропогенным воздействиям и др.)

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служили следующие виды рыб: окунь *Perca fluviatilis* L., плотва *Rutilus rutilus* L. и лещ *Abramis brama* L. отловленные в озерах Республики Карелия и лососевые виды рыб: радужная форель *Salmo gairdneri* R. и атлантический лосось (семга) *Salmo salar* L., взятые с рыбоводных заводов. Рыбу замораживали и хранили при -30°C не более 10 дней. В органах этих рыб, главным образом в печени, белых скелетных мышцах жабрах и почках определяли активность изоферментов: ЛДГ (КФ 1.1.1.27), МДГ (КФ 1.1.1.37), а-ГФДГ (КФ 1.1.1.8). Некоторые исследования проводили в комплексе с другими ферментами углеводного обмена: цитохром с оксидазой (ЦО) (КФ 1.9.3.1), альдолазой (КФ 4.1.2.13) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г-6-ФДГ) (КФ 1.1.1.49).

Гомогенизацию органов рыб осуществляли в 0.01 М трис-НСl буферном растворе (рН 7.5), содержащем 40% сахарозы и 0.1% тритона X-100. Выделение митохондрий проводили в специальной среде, содержащей 0,25 М раствор сахарозы приготовленного на 0,01М трис-НСl буфере (рН 7.4) с добавлением 0.001 М ЭДТА и 0,002 М гепарина общепринятым методом дифференциального центрифугирования, с некоторыми модификациями (Груздев, 1981). Экстракцию митохондриальных ферментов проводили двухкратным объемом 0,01 М трис-НСl буфера с рН 7.4, содержащим 0,1 % тритона X-100.

Изоферменты ЛДГ и а-ГФДГ окуня, а также изоферменты а-ГФДГ плотвы разделяли в 6% полиакриламидных цилиндрических гелях с применением комбинированной трис-глициновой буферной системы (рН 8.3) по Davis (Маурер, 1971), изоферменты МДГ окуня и плотвы - в однородной трис-цитратной буферной системе (рН 8.6), а изоферменты ЛДГ плотвы и изоферменты ЛДГ и МДГ лососевых рыб - в таких же гелях в комбинированной имидазол-вероналовой буферной системе (рН 7.8), (Маурер, 1971). Активность изоферментов определяли методом денситометрии окрашенных зон (Груздев, 1993).

Общую активность ферментов ЛДГ, МДГ, а-ГФДГ и Г-6-ФДГ определяли по общепринятым методикам (Кочетов, 1980). Активность ЦО определяли по методике Smith (Smith, 1955), при этом цитохром *c* восстанавливали двукратным по массе количеством аскорбиновой кислоты в 0,02 М фосфатном буферном растворе (рН 7,0) в течение 2 часов и затем на колонке с сефадексом G-25 выделяли в восстановленной форме свободным от избытка восстановителя. Активность альдолазы определяли по методу Besck в модификации Ананьева и Обуховой (Колб, Камышников, 1976). Количество экстрагированного из тканей белка находили по методике Bradford (Bradford, 1976).

Для изучения кинетических свойств и влияния на них разных температур изоферменты ЛДГ предварительно разделяли методом препаративного электрофореза в однородной 0,02 М трис-глициновой системе (рН 8,9), выделяли каждый в отдельности, отчищали на колонке с сефадексом G-25, и спектрофотометрически определяли максимальную скорость (*V*) реакции лактат→пируват и константу Михаэлис-Ментен (K_m) для лактата (рН 9,5) по методу Э. Корниш-Боудена (Корниш-Боуден, 1979).

Различия в активности ферментов и изоферментов оценивали по критерию Г Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Метаболическую сопряженность путей энергообмена приближенно оценивали по степени корреляции активности ферментов, функционирующих в этих путях. Коэффициенты корреляции между сравниваемыми показателями определяли по Пирсону и Спирмигу (Лакин, 1973).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 1. Распределение изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ в органах окуня, плотвы и радужной форели

На первом этапе работы нами было исследовано распределение изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ в различных органах и тканях исследуемых видов рыб. Идентификацию изоферментов проводили на основании уже известных литературных данных о распределении изоферментов исследуемых де-гидрогеназ в тканях рыб и особенностях метаболизма различных органов и тканей рыб.

Было обнаружено, что ЛДГ в белых скелетных мышцах и жабрах окуня представлена 3 изоферментами, условно обозначенными нами как: A_4 , A_2B_2 и B_4 (относительная электрофоретическая подвижность (*Rf*) соответственно при движении от анода к катоду равна 0,57; 0,68 и 0,8 (рис. 1)). В печени обнаруживается дополнительный изофермент D_4 (0,17), который является ткане- и видоспецифичным для окуневых рыб (Leibel, Peairs, 1990). При изучении спектра ЛДГ плотвы было выявлено пять изоферментов во всех исследованных тканях: A_4 (0,37) A_3B (0,48), A_2B_2 (0,58) AB_3 (0,69) и B_4 (0,81) (рис. 1),

что согласуется с литературными данными, полученными для карповых рыб (Brassington, Ferguson, 1976). Многочисленные изоферменты ЛДГ радужной форели состоят из нескольких типов субъединиц A¹, A'', B', B'', кроме этого в печени присутствуют еще специфические субъединицы D' и D'' (табл.1.). Субъединицы образуют группы по пять изоферментов и различного рода гетероизоферменты с набором субъединиц различного типа.

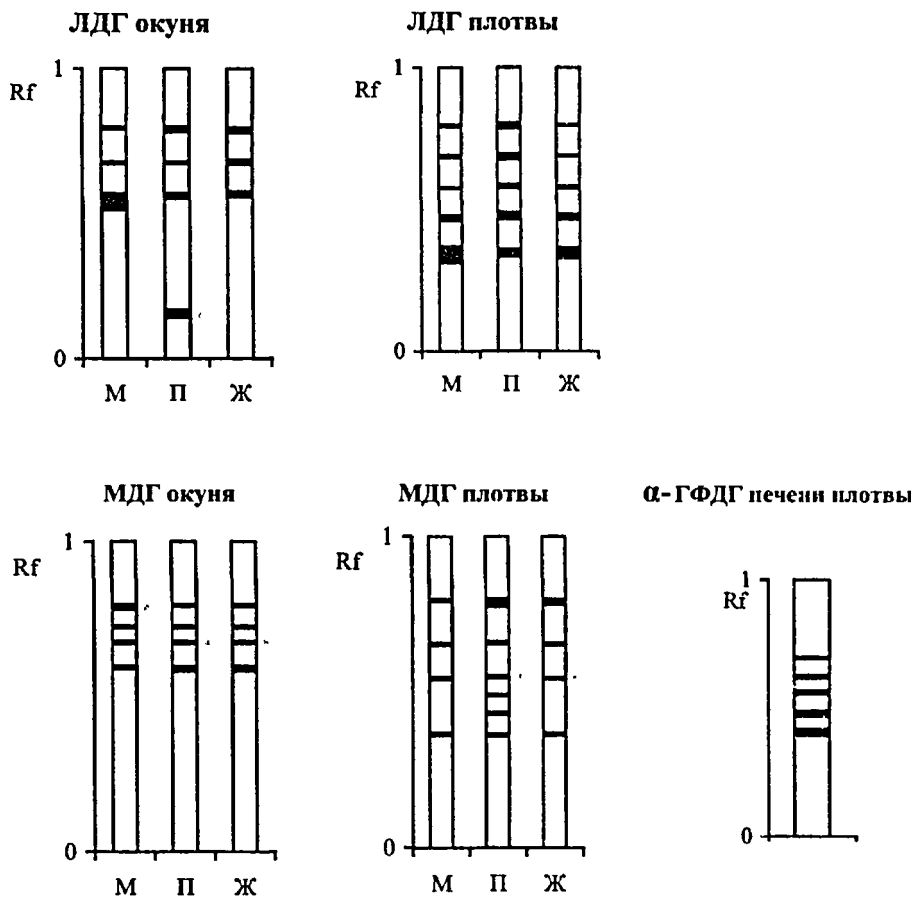


Рис. 1. Энзимограммы распределения изоферментов ЛДГ и МДГ в мышцах, печени и жабрах окуня и плотвы и изоферментов α-ГФДГ в печени плотвы

Таблица 1

Активность изоферментов и общая активность ЛДГ в органах радужной форели

Изоферменты ЛДГ	R_f	Относительная активность изоферментов (% от общей активности ЛДГ в органах)		
		Бел. мышцы	Печень	Жабры
A ₄	0,10	-	-	-
A ₁ A ₂ [*]	0,16	1,1	-	-
A ₂ A ₂ [*]	0,22	15	-	-
A ₁ A ₁ [*]	0,28	35,5	-	-
A ₂ [*]	0,33	40	-	-
x	0,37	-	-	-
x	0,42	2,5	-	-
x	0,45	-	-	-
x	0,50	-	-	-
B ₄	0,60	4	-	12
B ₁ B ₂ [*]	0,64	1,2	-	15
B ₂ B ₂ [*]	0,68	0,5	4	12
B ₁ B ₁ [*]	0,72	1,1	16	11
B ₁ [*] ₁ +D ₄	0,76	-	60	22
D ₁ D ₂ [*]	0,79	-	14	14,5
D ₂ D ₂ [*]	0,82	-	5,2	7,3
D ₁ D ₁ [*]	0,86	-	0,8	3
D ₂ [*]	0,91	-	-	2
Общая активность ЛДГ (ммоль субстрата/мин/г)		53,2 ± 2,1	18,6 ± 0,4	16,7 ± 0,2

Примечание: знаком «х» обозначены неидентифицированные гетероизоферменты.

Цитоплазматическая МДГ в исследованных органах окуня представлена в виде 4 изоферментов: A₂ (0,60), AB (0,68), BA (0,73) и B₂ (0,8) (рис. 1), что согласуется с литературными данными по изучению окуневых рыб (Clayton, Tretiak, 1971). Изоферменты AB и BA (по нашим обозначениям) предположительно отличаются на уровне четвертичной структуры. У плотвы цитоплазматическая МДГ белых мышц, печени и жабер представлена тремя изоформами A₂ (0,55), AB (0,66) и B₂ (0,82), как это показано ранее для карповых рыб (Starzyk, Merrit, 1980). Была обнаружена также митохондриальная МДГ плотвы, представленная в мышцах и жабрах одним изоферментом, обозначенным нами как Mi (0,37), а в печени тремя, M₁, M₂ и M₃ с Rfсоответственно 0,37; 0,43 и 0,49 (рис. 1). У радужной форели (гетерозигота по локусу B) обнаружено шесть изоферментов МДГ, представленные субъединицами типа: A, B' и B". Идентификацию изоферментов МДГ лососевых рыб проводили на основании литературных данных Бэйли с соавт. (Bailey, 1969). В связи с тем, что МДГ тэтраплондных видов рыб изучена очень ограниченно, у форели нами были исследованы не только белые мышцы, печень и жабры, но также красные мышцы, сердце, почки, гонады (V стадия зрелости гонад) (табл. 2).

Таблица 2

Активность изоферментов и общая активность МДГ
в тканях и органах радужной форели
(Ц — цитоплазматическая и М — митохондриальная фракции)

Изо- ЛДГ	R _f	Активность изоферментов											
		Бел. мыш.		Кр. мыш.		Серд.мыш.		Печень		Почки		Гонады	
		Ц	М	Ц	М	Ц	М	Ц	М	Ц	М	Ц	М
Относительная активность изоферментов во фракциях (%)													
A ₂	0,25	1	0,1	5	0,5	15	3	28	12	22	0,3	21	5
AB'	0,31	7	0,4	20	1	20	3	14	9,5	23	0,6	13	4
AB''+B' ₂	0,37	13	0,4	24	1	22	2	12	8	24	0,4	21	2
B'B''	0,42	16	1	22	1	15	1	4	4	16	0,3	5	1,6
B' ₂	0,50	60	1	24	2	17	2	3	3	13	0,2	21	3
x	0,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6
x	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6
x	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9
Суммарная относительная активность изоферментов во фракциях (%)													
		97	3	95	5	89	11	62	37	98	2	82	18
Общая активность фермента в органах (ммоль субстрата/мин/г), M±m													
		10,2±0,4		13,0±0,3		14,4±0,6		24,0±0,9		21,9±0,8		6,1±0,1	

Примечание: знаком «х» обозначены неидентифицированные изоферменты.

Важным результатом наших исследований было обнаружение в гонадах самцов форели (V ст. зр.) дополнительной изоферментной система МДГ, представленной тремя изоформами с R_f=0,75; 0,83 и 0,9 (табл. 2). Она обнаруживается только в митохондриальной фракции и в других исследованных органах и в гонадах самок не найдена. Следует отметить, что данная изоферментная система митохондриальной МДГ обнаруживается только на последних стадиях зрелости гонад, поэтому мы предполагаем, что она выполняет определенную специфическую функцию в процессе синтеза АТФ в сперматоцитах и этим способствует нормальному протеканию процессов сперматогенеза и оплодотворения, требующими, как известно, большого количества энергии. Наши предположения согласуются с данными литературы о существовании специфического изофермента лактатдегидрогеназы, обнаруженном преимущественно в митохондриальной фракции спермы и семенниках многих млекопитающих и в тестикулах у птиц (Baldwin, 1973; Vancov, 1977; Burkhart, 1982; Leibel, Peairs, 1990).

В тканях окуня обнаруживается только один изофермент а-ГФДГ. У плотвы в мышцах и жабрах фермент представлен одной изоформой, а в печени — пятью изоформами (рис.1), обозначенными нами как а-ГФДГ₋₃, -4 и -5 (R_f соответственно: 0,42; 0,49; 0,58; 0,63; 0,7). Этот факт, однако, не согласуется с данными о димерной структурой этого фермента (Basaglia, Cucchi, 1995). На основании полученных нами достоверных зна-

чений коэффициентов корреляции с цитохромоксидазой, МДГ и ЛДГ мышц и печени плотвы, с большой степенью вероятности можно предположить, что все пять изоферментов дифференцированы по направлению катализируемой ими реакции. Активность и распределение изоферментов а-ГФДГ радужной форели нами не изучалось в виду большого количества изоформ и невозможностью их идентификации, в связи с не изученностью этого фермента у лососевых рыб.

Глава 2. Исследование активности изоферментов ЛДГ, МДГ, а-ГФДГ и некоторых других ферментов углеводного обмена в органах окуней с различным уровнем накопления ртути в мышцах и обитающих в озерах отличающихся кислотностью (рН) и цветностью (гумифицированность)

Гидрохимические условия многих озер Карелии характеризуется пониженными значениями рН, слабой минерализацией и высоким уровнем содержания гуминовых кислот, определяющим цветность водоема. Отрицательное влияние ацидификации водоема на рыб проявляется, прежде всего, в нарушении ионорегуляторных механизмов дыхания. В результате этого подавляется интенсивность обмена дыхательных газов, происходят морфологические изменения жаберного аппарата (Виноградов и др., 1994; Матей и др., 1994). Одним из негативных последствий ацидификации водоемов является также то, что с понижением рН усиливаются процессы метилирования неорганического соединения — образования чрезвычайно токсического органического соединения — метилртути (Кузубова и др., 1989), которая аккумулируется в тканях и органах рыб (Комаровский, 1981; Патин, Морозов, 1981; Мур, Рамамурти, 1987). В связи с этим, представлялось интересным, исследовать изменения в активности ферментов углеводного обмена у рыб при воздействии на них комплекса факторов: высокого содержания ртути в мышцах, низкого уровня рН и повышенного содержания гуминовых кислот в водоеме. В качестве тест-объекта выбран окунь, потому что при закислении водоемов этот вид рыб исчезает последним, продолжая существовать в озерах уровень рН которых падает в весенний период до уровня 4.0. (Комов, 1997)

Для анализа использовали выборки рыб, отловленных в августе 2000г. из озер: Чучъярви (контрольное озеро: рН 5.1 светловодное,) и Вуонтеленьярви (рН 4.5 темноводное озеро с высоким уровнем содержания гуминовых кислот). Озера одинаковы по размерам и температурному режиму. Уровень содержания ртути в мышцах окуня из оз.Чучъярви составляет 0,1 мг/кг, а у окуня из оз.Вуонтеленьярви - 0,53-0,83 мг/кг. Выборки рыб не различались по возрасту, размерно-весовым данным, соотношению полов и степени зараженности гельминтами.

При сравнении активности ферментов углеводного обмена в жаберных лепестках окуней из контрольного и закисленного водоемов (рис. 2) не было обнаружено существенных различий в активности ЛДГ: у окуней из кислого водоема незначительно снижалась активность изофермента V_4 , катализирующего преимущественно превращение лактата в пируват и немного возрастала активность изофермента A_4 , катализирующего восстановление пирувата в лактат.

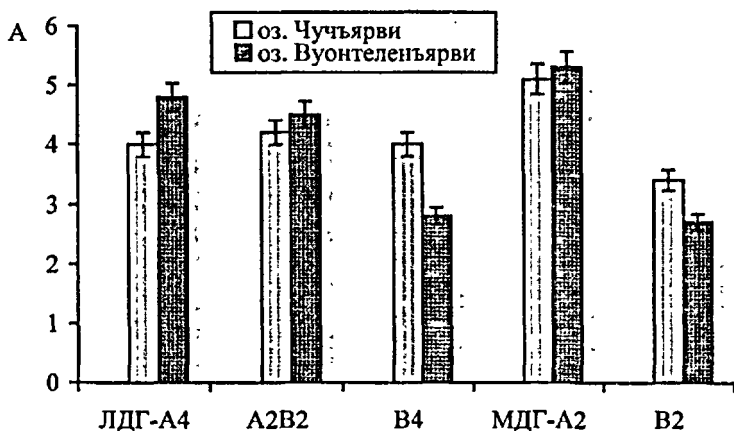


Рис. 2. Активность (А) изоферментов ЛДГ и МДГ в жабрах окуней из оз.Чучъярви и оз.Вуонтеленьярви (ммоль субстрата/мин/г)

В изоферментном спектре МДГ наблюдалось снижение активности изоформы B_2 , катализирующей, главным образом, перенос восстановительных эквивалентов НАДН в митохондрии. Общая активность ЛДГ почти не менялась, а МДГ - несколько снижалась. Изменения в активности ЛДГ и МДГ, хотя и не столь существенны, однако направлены в сторону некоторого снижения аэробного окисления пирувата в митохондриях и незначительного возрастания уровня анаэробного гликолиза, т.е. восстановления пирувата с помощью цитоплазматического НАДН до лактата. Следует отметить, что переключение характерного для рыб высокоэффективного с энергетической точки зрения аэробного распада углеводов на анаэробный гликолиз является характерным признаком при стресс-реакции и имеет приспособительный характер направленный на компенсацию сниженного уровня поглощения кислорода поврежденными жабрами (Лукияненко, 1983). Обращает на себя внимание очень высокая активность ЦО в жабрах у окуней из «неблагоприятного» водоема (1,1 и 1,8 к/г для оз. оз.Чучъярви и оз.Вуонтеленьярви, соответственно) что указывает на интенсификацию

окислительных процессов в хлоридных клетках, содержащих большое количество митохондрий (Hulbert et al., 1978). Активация окислительного метаболизма в жабрах вызвана, по-видимому, необходимостью усиления функционирования жаберного аппарата в связи с повышенной потребностью организма рыб в кислороде. Принимая во внимание результаты изменения активности ЛДГ и МДГ, указывающие на некоторое снижение аэробного окисления пирувата, можно предположить, что активация ЦО обусловлена увеличением использования не углеводных, а липидных источников энергии. Наши предположения подтверждаются и литературными данными (Kramer et al., 1992), согласно которым, интенсификация окислительных процессов при отравлении ртутью осуществляется в первую очередь за счет липидных источников энергии.

Сравнивая активность ферментов в белых скелетных мышцах рыб из исследованных водоемов, следует отметить снижение активности изофермента ЛДГ А4, активности сс-ГФДГ и альдолазы у окуней из «неблагоприятного» водоема (рис. 3). Наблюдающиеся различия в активности ферментов свидетельствуют об ослаблении процесса анаэробного гликолиза - основного источника АТФ во время интенсивных сокращений белых мышц рыб у окуней из оз. Вуонтеленъярви. Для двух выборок рыб уровни положительной корреляции между альдолазой и изоферментом At не отличались (+0,56 и + 0,66), однако у окуней из оз. Вуонтеленъярви сильно возростала положительная корреляция между а-ГФДГ и изоферментом А4 (от +0,29 до + 0,83) что, вероятно, указывает на возрастание метаболической сопряженности глицерофосфатного челночного механизма с гликолизом (Ленинджер, 1980; Guppy, Nochachka, 1978; Basaglia, Cucchi, 1995 и др.). В активности изоферментов МДГ не было обнаружено существенных различий.

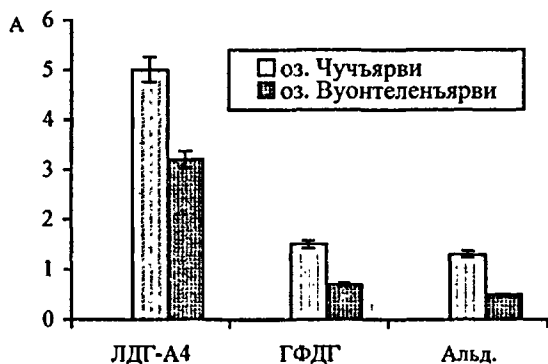


Рис. 3. Активность (Л) ферментов углеводного обмена в мышцах окуней из оз.Чучъярви и оз.Вуонтеленъярви (ммоль субстрата/мин/г)

Если в белых мышцах рыб равновесие лактатдегидрогеназной реакции сильно смещено в сторону образования лактата, то в печени эта реакция обычно протекает в обратном направлении вследствие высоких концентраций лактата и вовлечения образующегося пирувата в процесс синтеза глюкозы (глюконеогенез). Таким образом, избыточный лактат, поступающий в печень через систему кровообращения преимущественно из белых скелетных мышц рыб (Хочачка, Сомеро, 1977) используется для синтеза глюкозы. При изучении активности ферментов в печени рыб не было обнаружено достоверных различий в активности изоферментов ЛДГ A_4 , A_2B_2 и B_4 , а также в активности всех изоферментов МДГ (рис.4).

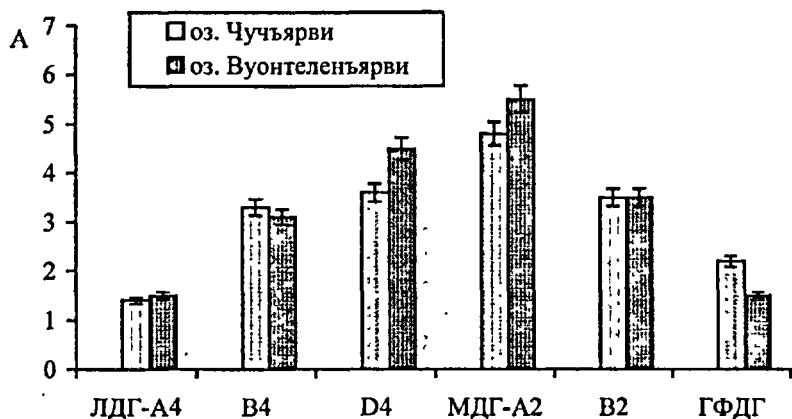


Рис. 4. Активность (А) ферментов углеводного обмена в печени окуней из оз.Чучъярви и оз.Вуонтеленъярви (ммоль субстрата/мин/г)

Результаты исследований показали, что углеводный обмен в печени окуней из оз. Чучъярви (контроль) осуществлялся за счет гликогена печени и углеводных источников мышечного происхождения, окисление мышечного лактата было умеренным. В печени окуней из оз. Вуонтеленъярви значительно повышена активность ЦО (1,4 и 2,7 к/г), что обычно наблюдается при усилении обмена веществ и синтеза АТФ. Достоверно возрастали как положительная корреляция между активностью ЦО и альдолазы печени (с +0,22 до +0,68), так и отрицательная корреляция между ЦО и мышечными ферментами - альдолазой (с +0,77 до -0,58), а-ГФДГ (с +0,44 до -0,56), изоферментом А» (с +0,42 до -0,54), что свидетельствует о том, что активация окислительного метаболизма печени осуществляется в значительной степени за счет углеводных источников печени. Возрастание положительной корреляции между печеночным изоферментом A_4 и ЦО (с -0,40 до +0,49) указывает на более интенсивное окисления

лактата через цикл трикарбоновых кислот. В процессе окисления лактата в пируват, катализируемом печеночным изоферментом А₄, может использоваться лактат, образующийся как в клетках печени, так и поступающий из мышц, а также из других органов, например, из жабер. Мы предполагаем, что мышечный лактат у окуней из оз. Вуонтеленьярви в большей степени, чем у окуней из оз. Чучъярви, использовался печенью в биосинтетических процессах. В частности, значительное увеличение активности специфичного для печени окуневых рыб изофермента D₄ и возрастание положительной корреляции между этим изоферментом и альдолазой печени (с -0,39 до +0,41) и изоферментом А» ЛДГ мышц (с -0,46 до + 0,67) подтверждает усиление глюконеогенеза из лактата, а также раскрывает значение этого изофермента для процесса глюконеогенеза печени. Особо отличительным признаком углеводного обмена в печени окуней из оз. Вуонтеленьярви было возрастание положительной корреляции между ГФДГ и всеми печеночными изоферментами ЛДГ и, а также с мышечным изоферментом А₄, что указывает на более интенсивное использование мышечного лактата в образовании глицерофосфата, несмотря на то, что активность а-ГФДГ была снижена на треть. В дальнейшем глицерофосфат может использоваться печенью в синтезе триацилглицеринов (Hannon, Sheridan, 1992). По крайней мере, исходя из некоторого снижения корреляции между ЦО и а-ГФДГ (с - 0,21 до •* 0,21), не предполагается усиление одного из альтернативных путей его - глицерофосфатного челночного механизма.

Глава 3. Влияние техногенных вод горнообогатительного производства на активность ЛДГ, МДГ, а-ГФДГ и других ферментов углеводного обмена органов плотвы

Для оценки воздействия токсических веществ на рыб и выявления возможных механизмов адаптации ферментов энергетического обмена в течение нескольких лет проводили сравнительное изучение активности ферментов углеводного обмена в органах плотвы обитающей в «хвостохранилище» (районохранилища инфильтрационных вод) Костомукшского горнообогатительного комбината (Республика Карелия). По данным гидрохимического анализа, техногенная вода ГОКа имеет повышенную минерализацию (до 480 мг/л), щелочное значение рН (до 8,5), высокое содержание ионов калия (до 140 мг/л), лития (до 50 мкг/л), сульфатов и нитритов. По сравнению с природным фоном повышено содержание тяжелых металлов, таких как Ni, Cr, Co, Si и др. Негативным фактором является также то, что вода в хвостохранилище имеет много мелкодисперсной механической взвеси, из-за постоянного взмучивания при поступлении фильтрационных вод. Механическая взвесь затрудняет функционирование жаберного и пищеварительного аппарата рыб и отрицательно влияет на все звенья биоценоза в водоеме. Контролем для исследований служила плотва, выловленная в чистом озере с аналогичным температурным режимом (оз. Лувозеро). Выборки рыб не

различались по возрасту, размерно-весовым данным, соотношению полов и степени зараженности гельминтами.

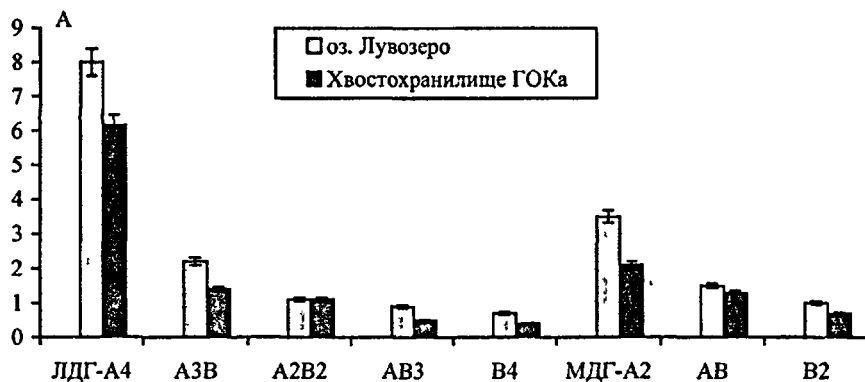


Рис 5. Активность (А) изоферментов ЛДГ и МДГ в белых мышцах плотвы (1998г) (ммоль субстрата/мин/г).

Исследования проведенные нами в 1998г. выявили значительные изменения в активности всех ферментов и нарушения в метаболизме рыб из хвостохранилища. В белых мышцах плотвы из хвостохранилища по сравнению с контролем значительно снижается активность ферментов участвующих в гликолизе: анаэробных изоферментов ЛДГ A_4 и A_3B (рис.5), а также активности альдолазы более чем в два раза. При этом снижается активность «аэробных» изоферментов ЛДГ B_4 и AB_3 и всех изоферментов и общей активности МДГ (рис.5), что указывает на снижение интенсивности процессов переноса восстановительных эквивалентов НАДН между цитоплазмой и митохондриями и использование их для аэробного синтеза АТФ. Как известно, анаэробный гликолиз играет важнейшую роль в энергообеспечении резких сокращений белых мышц, а АТФ образующаяся аэробным путем в митохондриях используется мышцами в восстановительный период после интенсивных сокращений или при крейсерском плавании (Ньюсхолм, Старт, 1977). Поэтому, указанные различия активности ферментов у плотвы из двух водоемов свидетельствуют, в целом, об ослаблении процессов энергообеспечения белых мышц рыб. Известно, что интенсивность пентозофосфатного пути (ПФП) окисления глюкозы в белых скелетных мышцах рыб очень низка, а в условиях гипоксии или нагрузки этот путь практически отсутствует (Малиновская, 1988). Видимо, поэтому, у плотвы из хвостохранилища ГОКа, испытывающей в некоторой степени гипоксическое состояние из-за нарушения функционирования жаберного аппарата, мы наблюдаем снижение активности ключевого фер-

мента этого пути - глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (на 25%) и, следовательно, интенсивности самого ПФП, позволяющее, таким образом, экономно расходовать глюкозу в условиях стресс-реакции. Подтверждением этому служит также достоверное снижение значения коэффициентов корреляции Г-6-ФДГ с ЦО (с -0,49 до -0,83).

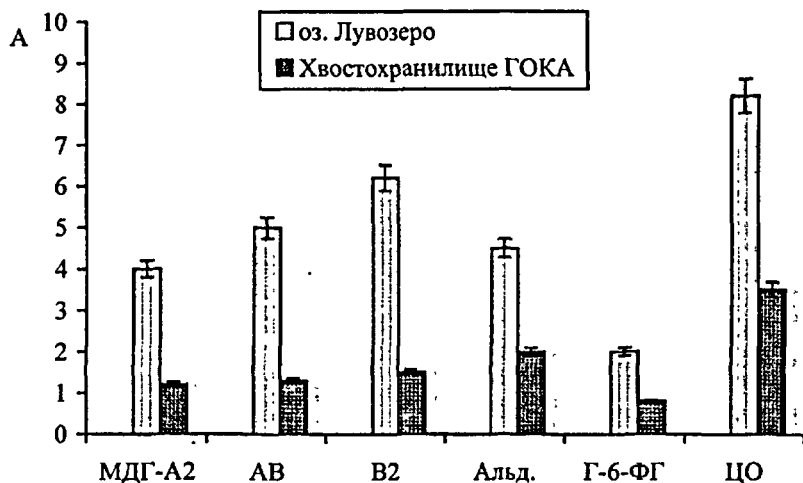


Рис. 6. Активность (А) ферментов углеводного обмена в печени плотвы в 1998г (ммоль субстрата/мин/г)

Очень существенные различия в активности ферментов наблюдаются в печени рыб. (рис. 6). Поскольку этот орган характеризуется высоким уровнем окислительных процессов, то снижение активности всех изоферментов МДГ (почти в 10 раз), а также активности ЦО (в 3 раза) свидетельствует о снижении интенсивности процессов окислительного фосфорилирования и аэробного синтеза АТФ. Подтверждением этому служит также то, что, активность анаэробных изоферментов ЛДГ - А₁ и А₃В, участвующих, главным образом, в превращении пирувата в лактат практически не изменяется, а активность альдолазы снижается почти в три раза, следовательно, количество пирувата окисляемого в митохондриях в цикле трикарбоновых кислот тоже должно снизиться. По нашему мнению, снижение окислительного метаболизма в печени может быть результатом гипоксического состояния. Обращает на себя внимание также значительное снижение активности Г-6-ФДГ и уровня корреляции Г-6-ФДГ со всеми изоферментами ЛДГ, особенно с А₄ (с +0,46 до -1,0) что указывает на уменьшение интенсивности ПФП, основная роль которого состоит в генерации восстановителя в форме НАДФН, необходимого для био-

синтетических процессов. Описанные изменения активности ферментов говорят о снижении интенсивности многих метаболических процессов, характерных для печени, что вероятно приводит к снижению ее окислительно-восстановительной и детоксикационной способности.

В почках рыб наблюдается ослабление гликолитических процессов, на что указывает снижение активности изоферментов ЛДГ и альдолазы (приблизительно на 20%), однако некоторое усиление аэробного метаболизма (возрастание активности МДГ на 30%), вероятно, связано с необходимостью дополнительного синтеза АТФ для обеспечения процессов осморегуляции в условиях повышенной минерализации воды.

По данным гидрохимического анализа Института водных проблем севера КарНЦ РАН, за последние несколько лет токсичность воды в хвостохранилище уменьшилась, а также снизилось количество мелкодисперсной механической взвеси, затрудняющей дыхание рыб. Видимо, по этому, исследования 2001г. не выявили таких серьезных изменений в углеводном обмене органов плотвы как в 1998 г. Например, в печени и почках плотвы существенных различий в активности изоформ ЛДГ и МДГ не было выявлено. Вероятно, что рыбы не испытывали сильного гипоксического состояния, так как изменения в активности ЦО отсутствовали. Как упоминалось выше, α -ГФДГ печени плотвы представлена пятью изоформами. На основании полученных нами достоверных значений коэффициентов корреляции с цитохромоксидазой, МДГ и ЛДГ мышц и печени мы предполагаем, что α -ГОДП плотвы участвует преимущественно в реакции образования глицерофосфата и переноса восстановительных эквивалентов NADH в митохондрии, а α -ГФДГ₃ участвует преимущественно в противоположной реакции - образовании диоксиацетонфосфата из глицерофосфата, связанной с процессом синтеза глюкозы в печени. Изоформы -2, -3 и -4 обладают промежуточными свойствами. По нашим данным, у рыб из хвостохранилища возрастает активность изоформы α -ГФДГ₁, что может указывать на усиление синтеза глицерофосфата. В данном случае он может использоваться печенью в синтезе запасных липидов - триацилглицеринов (Harmon, Sheridan, 1992). По крайней мере, учитывая отсутствие изменений в активности ЦО и α -ГФДГ мы не предполагаем усиление глицерофосфатного челночного механизма переноса восстановительных эквивалентов.

Глава 4. Сравнительное изучение активности изоферментов ЛДГ, МДГ, а также других ферментов углеводного обмена в тканях и органах здоровой и больной некрозом плавников молоди семги

На рыбоводных заводах Европейского Севера широко распространено заболевание молоди атлантического лосося *Salmo salar* некрозом плавников. В отдельные годы им поражается 70-80% особей, а иногда и вся продукция рыбозаводов. Несмотря на то, что после выпуска рыб в их естественный водоем

обитания наблюдается частичная регенерация некротических участков плавников, заболевание в целом приводит к снижению жизнеспособности молоди и резкому уменьшению численности популяции. Считается, что первичной причиной некроза у рыб являются стрессовые факторы, такие как: низкая температура воды, неполноценное питание, скученность, загрязненность воды и др., при которых наступает действие не менее двух видов бактерий *Flexibacter* и *Aeromonas salmonicida* (Schneider R., Nicholson B.L., 1980). На этом фоне у ослабленных рыб начинается развитие болезни. Пораженные участки кожи часто инфицируются грибом *Saprolegnia sp.* > что приводит к развитию сапролегниоза (Hatai et.al., 1977). В дальнейшем происходит поражение более глубоких слоев кожи и подлежащих мышц и образование язв (Mann 1975). Биохимическая картина этого заболевания до настоящего времени практически не выяснена, имеются только данные гематологического анализа (Полина и др. 1990; Prasad Y., Quishi T.A. 1995), указывающие на нарушение кровообращения у больных рыб. В связи с этим представлялось интересным исследовать активность некоторых ферментов углеводного обмена у здоровой и больной некрозом плавников молоди семги двухлетнего возраста, взятой с Кемского рыбоводного завода в летний период.

При сравнении активности ЛДГ МДГ, альдолазы и ЦО ряда тканей и органов больной и здоровой молоди семги выявлены определенные различия: в белых мышцах больных рыб по сравнению со здоровыми рыбами снижается активность изоферментов ЛДГ с субъединицами А, т.е. изоферментов гликолитического типа, а также активность гетероизоферментов и аэробных изоферментов группы В (табл. 3). Общая активность ЛДГ уменьшается на 15 %. Поскольку гликолиз играет важнейшую роль в энергообеспечении интенсивных движений белых мышц, а аэробные метаболические реакции - в процессах их восстановления в периоды покоя, то такие изменения в активности ЛДГ могут указывать на снижение плавательной активности и рывковой способности больных рыб. Следует отметить, что единственный изофермент, активность которого у больных рыб возрастает это — В\ Этот изофермент из группы В обладает относительно анаэробными свойствами и во многих тканях выполняет функцию изоферментов группы А, обладая при этом несколько отличными свойствами (Lim et al., 1975). Возможно повышение его активности компенсирует снижение активности изоферментов группы А для относительного поддержания уровня гликолиза в этих мышцах. В красных мышцах больных рыб наблюдаются более значительные изменения. Активность всех изо-ЛДГ, особенно, изоферментов группы А и группы В снижается в 1.5 раза. Общая активность ЛДГ снижается более чем на 30% (табл.3). Активность альдолазы достоверно уменьшается в 3 раза, что вместе с характерными изменениями в спектре ЛДГ указывает на снижение интенсивности процесса гликолиза в красных мышцах. Следует отметить, что снижение интен-

сивности гликолиза в мышцах, является характерным признаком при многих патологических состояниях, в частности при повреждении целостности тканевых структур (Шамрай, 1974). У МДГ наблюдается снижение общей активности, и активности всех цитоплазматических изоферментов. Однако активность митохондриальных изоформ при этом повышалась, что может свидетельствовать о некотором повышении уровня аэробных процессов в митохондриях.

Поскольку некротическим процессам непосредственно подвергались плавники рыб, представлялось интересным проследить картину изменения активности ферментов в мышцах опорного аппарата плавников. Эти мышцы сочетают в себе свойства белых и красных мышечных волокон, поэтому здесь достаточно активны как анаэробные, так и аэробные изоформы ЛДГ. У больных рыб наблюдается значительное увеличение активности относительно анаэробных изо-ЛДГ - V^4 почти в три раза и V^3V' почти в два раза (табл.3). Учитывая, что общая активность ЛДГ не меняется, можно предположить, что повышение активности этих изоформ группы В, носит компенсаторный характер для поддержания необходимого уровня энергетического обмена в мышцах плавников при снижении активности анаэробных изоферментов в группе А и аэробных - в группе В. Изменения в активности МДГ, свидетельствуют о перераспределении потока восстановительных эквивалентов NADH между цитоплазмой и митохондриями в работе малатного челнока. Так, активность цитоплазматической МДГ V_2 , катализирующей перенос восстановительных эквивалентов NADH из цитоплазмы в митохондрии достоверно снижается более чем на 30%. При этом, незначительно возрастает активность митохондриального изофермента V_2 . Общая активность МДГ снижается.

Известно, что при различных патологических состояниях в некоторых органах и тканях наблюдается снижение уровня аэробных окислительных процессов (Шамрай, 1974). Подобные биохимические изменения наблюдаются в печени больных рыб: например, незначительно снижается активность аэробных изоферментов ЛДГ с субъединицами V' (табл. 4),-активность ЦО снижается в 1.5 раза. В этом случае, наблюдающееся некоторое повышение общей активности ЛДГ и относительно анаэробных изоформ с субъединицами V'' , по-видимому является реакцией направленной на частичное восполнение уровня АТФ по средством гликолитического пути, из-за сниженного уровня аэробного метаболизма. Низкая активность альдолазы у больных рыб (в 2 раза ниже, чем у здоровых), по нашему мнению, также указывает на снижение уровня окисления глюкозы клетками печени. Активность специфических для печени лососевых рыб изоферментов ЛДГ группы D, участвующих главным образом в глюконеогенезе, у больных рыб была несколько выше (табл. 4), чем у здоровых. Возможно, это является ответной реакцией на усиление гликолиза в органах и тканях больных рыб, в частности в жабрах и самой печени (Ironow, 1974).

Таблица 3

Активность изоферментов и общая активность ЛДГ в органах здоровой и больной некрозом плавников молоди семги

Изо-ЛДГ	Активность изоферментов ЛДГ, М±m (мкмоль субстрата/мин/г)					
	Мышцы плавников		Мышцы белые		Мышцы красные	
	контр.	некроз	контр.	некроз	контр.	некроз
A ₄	82±4	68±3 *	43±3	46±4	11±1	8±1
A ₃ A*	238±21	252±32	148±12	140±13	69±7	38±3 *
A ₂ A* ₂	318±27	330±45	222±32	197±21	125±2	60±3 *
A'A* ₃	298±36	278±37	228±3	181±7 *	122±5	57±2 *
A* ₄	144±7	112±5*	111±5	83±5 *	50±2	25±1*
x	130±7	96±9 *			29±4	19±2
x	146±15	100±12	21±2	15±2	26±3	18±2
x	28±13	6±1	14±2	11±3	7±2	7±1
x	16±3	10±2			12±2	11±1
B ₄	240±15	194±5 *	11±1	10±2	270±16	221±11 *
B ₃ B*	158±13	134±12	8±2	7±1	136±2	105±5 *
B ₂ B* ₂	94±7	112±9	5±1	5±1	57±7	45±5
B'B* ₃	78±3	134±6 *	5±1	5±1	32±5	20±2
B* ₄	74±2	206±7 *	5±1	6±1	23±3	14±1 *
Общая актив. ЛДГ	1944 ±145	2032 ±178	821 ±75	706 ±31	969 ±58	648 ±46 *

Примечания: * - различия достоверны при $p \leq 0,05$

Знаком «х» обозначены неидентифицированные гетероизоферменты

Таблица 4

Активность изоферментов и общая активность ЛДГ в печени и почках здоровой и больной некрозом плавников молоди семги

Изо-ЛДГ	Активность изоферментов ЛДГ, М±m (мкмоль субстрата/мин/г)			
	Печень		Почки	
	здоровые	некроз	здоровые	некроз
B ₄	-	-	234±11	255±23
B ₃ B*	54±3	45±2	275±12	275±27
B ₂ B* ₂	207±13	180±15	249±23	234±12
B'B* ₃	477±23	486±22	275±31	255±32
B* ₄ + D* ₄	945±67	1170±78 *	324±30	304±33
D ₃ D*	189±12	225±21 *	84±9	70±3
D ₂ D* ₂	71±3	90±2 *	55±2	38 ±1 *
Общая активность ЛДГ	1943± 129	2196±131	1496± 123	1431± 140

Примечание: *- различия достоверны при $p \leq 0,05$

ВЫВОДЫ

1. Показана ткане- и видоспецифичность изоферментов ДЦГ, МДГ и а-ГФДГ у исследованных видов рыб, отражающие специфичность выполняемой ими функции в различных *путях* углеводного обмена органов рыб.
2. Выявлены тканеспецифичные различия в активности изоферментов ЛДГ, МДГ, активности а-ГФДГ, а также других ферментов углеводного обмена, окуней из озер, различающихся по рН, цветности (гумифицированности) и накоплению ртути в мышцах.
3. Результаты изучения активности изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ в органах плотвы при загрязнении водоема отходами горнообогатительного производства указывают на их участие в перестройке углеводного обмена рыб. Показано, что степень изменения в активности ферментов углеводного обмена коррелирует с уровнем токсического воздействия.
4. Показан компенсаторный характер изменения в активности изоферментов ЛДГ в различных типах мышц при заболевании молоди семги некрозом плавников. Обнаруженные изменения в активности исследуемых ферментов в жабрах и печени больных рыб указывают на снижение интенсивности аэробных метаболических процессов.
5. Общие и специфические особенности изменения в активности изоферментов ЛДГ, МДГ и а-ГФДГ в ответ на воздействие различных факторов среды свидетельствуют об их эколого-биохимической роли в развитии адаптивных реакций рыб выражающихся, как правило, в изменении соотношения уровня аэробных - анаэробных процессов.

Список работ опубликованных по теме диссертации:

1. Груздев А.И., Мещерякова О.В., Немова Н.Н. Ферменты углеводного обмена у плотвы при влиянии промстоков Костомукшского ГОКа // Тез. докл. Всероссийского совещания и выездной научной сессии отделения океанологии, физики атмосферы и географии РАН «Антропогенное воздействие на природу севера и его экологические последствия». Кольский НЦ, Апатиты, 1998. С. 74-75.
2. Груздев А.И., Мещерякова О.В. Ферменты углеводного обмена при некоторых заболеваниях молоди семги // Тез. докл. Международной конференции и выездной научной сессии отделения общей биологии РАН «Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова Восточной Фенноскандии. Карельский НЦ, Петрозаводск. 1999. С. 121.
3. A.I.Gruzdev, O.V.Meshcheryakova Carbohydrate metabolism enzymes in some diseases of salmon. 1st International conference «Enzymes in the environment: activity, ecology and applications». Granada, Spain, 1999. P. 126.
4. Мещерякова О.В, Груздев А.И. Влияние кислотности и цветности водоема на активность некоторых ферментов углеводного обмена в тканях окуня *Perca fluviatilis* L. // Тез. докл. IX Всероссийской конференции по экологической физиологии и биохимии рыб. Ярославль. 2000. С. 47.

5. Мещерякова О.В., Груздев А.И. Электрофоретическое изучение изоферментов малатдегидрогеназы в тканях и органах радужной форели *Salmo gairdneri Richardson* // Тез. докл. Международной конференции «Атлантический лосось: биология, охрана и воспроизводство» КарНЦ, Петрозаводск. 2000. С.37.
6. Груздев А.И., Мещерякова О.В., Немова Н.Н. Роль изоферментных систем лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и глицерофосфатдегидрогеназы в адаптациях окуня к среде обитания в эвтрофном водоеме // Тез. докл. Международной конференции «Биоразнообразие европейского севера». Карельский НЦ, Петрозаводск. 2001. С. 49.
7. Мещерякова О.В. Изоферменты лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и α-глицерофосфатдегидрогеназы в тканях окуня *Perca fluviatilis L* и плотвы *Rutilus rutilus L*. Вестник молодых ученых. Серия: Науки о жизни 2002г., № 4, с. 47-51.
8. О. В. Мещерякова, А. И. Груздев, Н. Н. Немова Оценка токсического воздействия промстоков Костомукшского ГОКа по степени изменения активности ферментов углеводного обмена плотвы *Rutilus rutilus L* // Тез. докл. Всероссийской Конференции «Современные проблемы водной токсикологии» ИБВВ РАН, Борок, Ярослав. обл. 2002. С. 64.
9. О.В. Мещерякова Изменение активности ферментов углеводного обмена плотвы *Rutilus rutilus L* как реакция на токсическое воздействие промстоков Костомукшского горнообогатительного комбината // Матер, докл. X Молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» УрО Коми НЦ РАН, Сыктывкар. 2003. с. 43-45.
10. Васильева О.Б., Мещерякова О.В. Некоторые особенности липидного и углеводного обменов мидий *Mytilus Edulis* Белого моря в условиях краткосрочной гипоксии. Матер, докл. X Молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» УрО Коми НЦ РАН, Сыктывкар. 2003. с. 45-47.
11. О. В. Мещерякова, А. И. Груздев, Н. Н. Немова Сравнительная энзиматическая оценка углеводного обмена окуней *Perca fluviatilis L* из водоемов с различным уровнем содержания гуминовых кислот. Известия РАН, серия биологическая. № 1, 2004. с. 21-26.
12. Gruzdev A.I. Meshcheryakova O.V. Gruzdeva L.I. Kovalenko T.I. Biochemical adaptation of soil nematodes. The II International congress "Enzymes in the environment: activity, ecology and application" Praha, 2003. Abstract P. 128.
13. О. В. Мещерякова, А. И. Груздев, Н. Н. Немова Влияние гипоксии и солёности на активность ферментов углеводного обмена мидий *Mytilus edulis* Белого моря // Тезисы докл. Международной конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов европейского севера» УрО Коми НЦ РАН, Сыктывкар. 2003. С. 43.

Изд. лиц. № 00041 от 30.08.99. Подписано в печать 18.03.04. Формат 60х84 1/16.

Бумага офсетная. Гарнитура «Times». Печать офсетная.

Уч.-изд. л. 1,5. Усл. печ. л. 1,4. Тираж 100 экз. Изд. № 20. Заказ № 406

Карельский научный центр РАН
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50
Редакционно-издательский отдел

№ - 5667